

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-294281

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)12月25日

C 07 D 498/14

8415-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全17頁)

⑭ 発明の名称 オキサゾピロロキノリン類の製造法

⑮ 特 願 平2-251945

⑯ 出 願 平2(1990)9月25日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)11月13日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 平1-292459

⑳ 発 明 者 浦 上 貞 治 東京都港区西新橋1丁目1番3号 三菱瓦斯化学株式会社
本社分室内

㉑ 発 明 者 伊 藤 智 恵 子 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会
社新潟研究所内

㉒ 発 明 者 小 林 寿 生 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会
社新潟研究所内

㉓ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉔ 代 理 人 弁理士 小堀 貞文

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

オキサゾピロロキノリン類の製造法

2. 特許請求の範囲

メタノールを炭素源とする培地中でピロロキノリンキノンを生産する能力を有する細菌を培養してピロロキノリンキノンを含有する培養液を得、該培養液に各種アミノ酸およびモノメチルアミンから選ばれた少なくとも1種を添加し、該培養液中のピロロキノリンキノンを酸素の存在下でオキサゾピロロキノリン類に変化させることを特徴とするオキサゾピロロキノリン類の製造法。

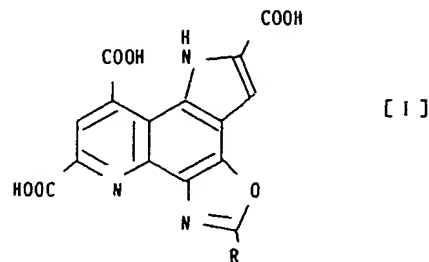
3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、オキサゾピロロキノリン類の製造方法に関し、さらに詳細には、細菌を使用して得られたピロロキノリンキノンからオキサゾピロロキノ

リン類を製造する方法に係わる。

オキサゾピロロキノリン類は、別名5位置換2,8,10-トリカルボキシー1H-オキサゾ[5,4-h]-ピロロ[2,3-f]キノリン(以下総称してOPQ類と記す)であり、化学構造式は、下記的一般式Iのごとくである。



[Rは、HあるいはR'-CH(NH₂)-COOHで示されるα-アミノ酸のR'と同じ。]

OPQ類は、ピロロキノリンキノン(以下PQ類と記す)の誘導体であり、今後、医薬品として

開発しうる重要な物質である。なお、PQQは、1979年にメタノール酸化性細菌のメタノール脱水素酵素の補酵素として見い出された。

〔従来技術、発明が解決しようとする問題点〕

PQQは、細菌に限らず、真核生物のカビ、酵母、さらには、哺乳動物にも存在し、補酵素として重要な働きを担っている。また、さらに、近年までに細胞の増殖促進作用（特開昭61-58584号公報、同63-233783号公報）、抗白内障作用（特開昭63-41421号公報、同63-48215号公報、同64-29313号公報）、肝臓疾患予防治療作用（特開昭63-192717号公報）、創傷治癒作用（特開昭63-152309号公報）、抗アレルギー作用（特開昭63-17493号公報）、逆転写酵素阻害作用（特開昭63-156724号公報、特開平1-29313号公報）およびグリオキサラーゼI阻害作用-制癌作用（特開昭63-215628号公報、特開平1-29313号公報）など多くの生理活性が明らかにされている。

しかしながら、PQQは、腎毒性を有することが近年明らかにされ（渡辺ら、Hiroshima J. Med.

Sci., 第38巻, 1号, 第49~51頁（1989年））、毒性および腎毒性が低く安全なPQQ誘導体の開発が望まれている。

本発明者らは、種々のPQQ誘導体について、腎毒性および急性毒性試験を行なったところ、オキサゾピロロキノリン類（OPQ類）がこれらの毒性を大幅に軽減していることを見出した。

しかし、OPQ（前記の一般式IにおいてR=Hの場合に相当）は、PQQとグリシンを反応させて得られることが知られている（平成元年度日本化学会講演要旨集 2Ⅲ B34）。しかしながら、この方法においては、不純物を含まない高純度のPQQが使用されている。PQQは、通常細菌を使用して生産されるが、このときに得られる培養液にはPQQの他に細菌菌体、蛋白質および糖類などの細菌内物質、培地成分ならびに副生成物などの夾雑物が多種多量に含まれており、これらの夾雑物が反応に悪影響を及ぼすことが危惧され、かつ、PQQの醗酵生産が終了した後は、PQQは蛋白質などと急速に反応して、損耗されるので、

このPQQの損耗を防ぐために、この培養液から速やかにPQQを分離・回収し、さらに必要に応じて精製されたPQQがOPQの生産に使用されていた。

しかしながら、培養液からのPQQの分離・回収および精製には煩雑な工程が必要であり、また、培養液中のPQQの蓄積量が極めて低いことから、これを効率よく分離・精製するには、さらに複雑な工程が必要である。このように、手数をかけて得られる高純度のPQQを使用することは、OPQの工業的生産に際して、重大な隘路となっていた。

〔問題を解決するための手段、作用〕

本発明者らは、細菌を用いるOPQ類の培養生産方法を種々検討した結果、PQQを生産する能力を有する細菌を、メタノールを炭素源とする培地中に培養し、培養液中にPQQを蓄積させ、引き続きこの培養液に、各種アミノ酸およびモノメチルアミンのうち少なくとも一種を添加し、酸素の存在下でPQQとこれらの化合物とを反応さ

せることにより、培養液中に蓄積されたPQQが効率よくOPQ類に転換されることを見出し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は、メタノールを炭素源とする培地中でピロロキノリンキノンを生産する能力を有する細菌を培養してピロロキノリンキノンを含有する培養液を得、該培養液に各種アミノ酸およびモノメチルアミンから選ばれた少なくとも一種を添加し、該培養液中のピロロキノリンキノンをオキサゾピロロキノリン類に変化させることを特徴とするオキサゾピロロキノリン類の製造法である。

本発明において使用される細菌としては、メタノールの酸化性を有し、かつ、PQQを菌体外に生産する能力を有する細菌であれば、いずれでもよいが、これらの菌の代表的な菌株としては、

1. メチロバチルス属に属する

メチロバチルス グリコゲネス ATCC 29475 (=JCM 2850=NCIB 11375)、同 ATCC 21275 (=JCM 2841)、同 ATCC 21452 (=JCM 2842)、同 ATCC

21961(=JCM 2843)、同 ATCC 21852 (=JCM 2840 = NCIB 11376)、同 ATCC 21369(=JCM 2844)、同 ATCC 21958(=JCM 2847)、同 ATCC 21963(=JCM 2848)、同 ATCC 21370(=JCM 2849)、同 ATCC 21372(=JCM 2852)、同 ATCC 21959、同 ATCC 21371(=JCM 2853)、同 ATCC 21957、同 ATCC 21276(=JCM 2854)、同 ATCC 21453(=JCM 2855)、同 ATCC 21962 (=JCM 2856)、同 ATCC 21704(=JCM 2857)、同 ATCC 21980(=JCM 2858)、同 ATCC 21439、同 NCIB 10508(=JCM 2859)、同 NCIB 10509、同 NCIB 10510(=JCM 2880)、同 NCIB 10511、同 NCIB 10512 (=JCM 2861)、同 NCIB 10513、同 NCIB 10514、同 NCIB 10592(=JCM 2862)、同 NCIB 10593、同 NCIB 10594(=JCM 2863)、同 NCIB 10595、同 NCIB 10596(=JCM 2864)、同 JCM 2851(=NRRL B-5458)、同 JCM 2866、同 PERM P-1692、同 PERM P-1693、同 PERM P-1694、同 PERM P-2182、同 PERM P-2184、同 PERM P-2247、同 PERM P-2661、同 PERM P-2662、同 PERM P-2663、同 PERM P-4036、同 PERM P-40

(=JCM 2811=NCIB 9421)。

メチロバクテリウム ロデシアナム NCIB 12249、同 ATCC 21611(=JCM 2807)、同 ATCC 21612(=JCM 2808)、同 ATCC 21613(=JCM 2809)、同 ATCC 21614(=JCM 2810)、同 NCIB 10597、同 NCIB 10598 (=JCM 2812)、同 NCIB 10599(=JCM 2813)、同 NCIB 10600(=JCM 2814)、同 NCIB 10601(=JCM 2817)、同 NCIB 10602(=JCM 2815) および 同 NCIB 10611(=JCM 2816)。

メチロバクテリウム ザットマニー NCIB 12243、同 NCIB 10603(=JCM 2818)、同 NCIB 10604(=JCM 2825)、同 NCIB 10606(=JCM 2819)、同 NCIB 10607(=JCM 2820)、同 NCIB 10608(=JCM 2821)、同 NCIB 10609(=JCM 2822)、同 NCIB 10610(=JCM 2823) および 同 NCIB 10612(=JCM 2824)。

メチロバクテリウム オルガノフィラム ATCC 27886(=JCM 2833)。

メチロバクテリウム メソフィリカス ATCC 29983(=JCM 2829=NCIB 11561)。

メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB

37、同 PERM P-4038、同 PERM P-4039、同 PERM P-4040、同 PERM P-4041、同 PERM P-4042 および 同 PERM P-4043。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第36巻, 第502-511頁(1986)に準拠した)。

2. メチロフィルス属に属する

メチロフィルス メチロトロファス NCIB 10515 および 同 ATCC 31228(=NCIB 11809)。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第37巻, 第446-448頁(1987)に準拠した)。

3. メチロバクテリウム属に属する

メチロバクテリウム エクストロクエンシス DSM 1337(=JCM 2802=NCIB 9399)、同 JCM 2803(=NCIB 10409)、同 ATCC 8457(=DSM 1340=IAM 1081=JCM 2804=NCIB 2879)、同 ATCC 14718(=DSM 1338=JCM 2805=NCIB 9133)、同 DSM 1339(=JCM 2806=NCIB 9686) および 同 NCIB 10409、

メチロバクテリウム ロディナム ATCC 14821

12417 および 同 NCIB 11272、

メチロバクテリウム ラジオトレランス IAM 12099(=ATCC 27329=JCM 2830=NCIB 10815)、同 IAM 12098(=JCM 2831)、同 NCIB 9142 および 同 NCIB 9143、ならびに

メチロバクテリウム エスピー ATCC 21438(=JCM 2827)、同 IAM 12623(=JCM 2834)、同 JCM 2832、同 NCIB 9141、同 NCIB 9145、同 NRRL B-3449、同 PERM P-4893、同 PERM P-4894、同 PERM P-4895、同 PERM P-4896、同 PERM P-4897 および 同 PERM P-9466。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第33巻, 第875-877頁(1983) および第38巻, 第124-127頁(1988)に準拠した)。

4. アンシロバクター属に属する

アンシロバクター アキユアティクス ATCC 25398(=CCM 1786=DSM 101=NCIB 9271)、同 ATCC 27088(=DSM 334)、同 ATCC 27069、同 ATCC 21373 (=DSM 1106)、同 NCIB 10516(=DSM 2457)、同 DSM 2868(=PERM P-4416)、同 DSM 2867(=PERM

P-4417)、同 DSM 2668(=FERM P-4418) および 同 DSM 2669(=FERM P-4419)、ならびに
アンシロバクター エスピー DSM 1107、同
DSM 1108、同 DSM 1277、同 DSM 2455 および 同
DSM 2456。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第38巻, 第415-421頁(1986)に準拠した)。

5. ハイホミクロビウム属に属する

ハイホミクロビウム ブルガレ NCIB 9898、同
NCIB 9775、同 DSM 1584、同 NCIB 11052、同
NCIB 9696、同 DSM 1586、同 NCIB 9897、同
NCIB 9899、同 NCIB 10099、同 NCIB 10342(=DSM
1585) および 同 NCIB 11053、ならびに
ハイホミクロビウム メチロボラム IPO 14180、
同 NCIB 10517 および 同 DSM 1869(=NCIB 11706)。

(菌種名は、Journal of Applied Microbiology, 第33巻, 第521-542頁(1987)に準拠した)。

6. キサントバクター属に属する

キサントバクター オートトロフィカス DSM

432、同 DSM 431、同 DSM 685、同 DSM 1393、同
DSM1618、同 DSM 2009 および 同 DSM 2267、およ
び

キサントバクター フラバス DSM 338(=NCIB
10071)。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第28巻, 第573-581頁(1981)に準拠した)。

7. アシドモナス属に属する

アシドモナス メタノリカ JCM 6891(=INET
10945) および 同 JCM 3712(=FERM P-2664)。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第39巻, 第50-55頁(1989)に準拠した)。

8. パラコッカス属に属する

パラコッカス デニトリフィカンス ATCC17441
(=DSM 85=IAM 12479=NCIB 11827)、同 ATCC13543
(=CCM 982=NRRL B-3784)、同 ATCC 19367 (=DSM
413=IPO 13301=NCIB 8944=NRRL B-3785)、同 CC
M 1398(=DSM 415=NCIB 9722) および 同 IPO 124

42. ならびに

パラコッカス アルカリフィルス JCM 7364
(=FERM P-9282)、同 FERM P-9280 および 同 FERM
P-9281。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第39巻, 第116-121頁(1989)に準拠した)。

9. チオバチルス属に属する

チオバチルス ノベルス ATCC 8093(=CCM 1077
=DSM 506=IPO 12443=NCIB 9113) および 同 NCIB
10456。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第30巻, 第225-420頁(1980)に準拠した)。

10. メチロファーガ属に属する

メチロファーガ マリーナ ATCC 35842(=NCMB
2244)。

メチロファーガ サラシカ ATCC 33148(=IAM 1
2458=NCMB 2163)、同 NCMB 2162(=FERM P-3622)
および 同 ATCC 33145、ならびに

メチロファーガ エスピー FERM P-3619、同
FERM P-3620、同 FERM P-3623および 同 FERM P-
3624。

(菌種名は、International Journal of Systematic Bacteriology, 第37巻, 第402-406頁(1982)に準拠した)。

11. ミコバクテリウム属に属する

ミコバクテリウム メタノリカ FERM P-8823、
同 FERM P-8824、同 FERM P-8825、同 FERM P-88
26、同 FERM P-8827、同 FERM P-9464、同 FERM
P-9465および 同 FERM P-9497。

(ミコバクテリウム属に属するこれらの菌株の菌
学的性質は、特開昭63-28385号公報、同64-510
77号公報および同64-60371号公報に記載されてい
る。) などがある。

なお、前記のこれらの菌株はすべて公知である。
また、これらの菌株より得られた変異株も使用す
ることが出来る。

これらのPQQ生産菌を培養するにあたって用
いられる栄養培地は、主炭素源として、メタノー

ルを含有することが必要である。さらに培地成分として、通常の窒素源、無機物の適量が使用される。

窒素源としては、通常は、たとえば、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等が用いられ、無機塩類としては、通常は、たとえばリン酸塩、マグネシウム塩、鉄塩、その他必要に応じて微量金属塩が用いられる。また、使用菌株が栄養要求性を示す場合には、その要求性物質を培地に添加する必要がある。

また、メチロファーガ属細菌は、生育にNaClが必要なので、培地中に、NaClを2~4重量%となるように添加するか、あるいは、培地作成に用いる水として海水を使用する必要がある。

培養温度は、通常25~45℃の範囲で各菌株にとって生育、増殖に適した温度を選択すればよい。

培養pHは、通常6~8の範囲で各菌株にとって生育、増殖に適したpHを選択する。しかし、アシドモナス属細菌の生育pHは、2.0~5.5であり、パラコッカス アルカリフィルスの菌株の生育pHは、

ロシン、グルタミン、セリン、アスパラギン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン、システインなどがある。

これらの化合物のうち、光学活性体のあるものは、D体、L体、あるいは混合物のいずれでもよい。

また、モノメチルアミンとしては、塩酸塩などのモノメチルアミン塩類を用いることも可能である。

これらの化合物の添加時期は通常培養液中のPQQ濃度が10 μ g~10g/l、好ましくは100 μ g~10g/lとなった時である。添加量は、培養液中のPQQに対して1モル倍以上、好ましくは5モル倍以上、更に好ましくは大過剰とすることがよく、実際には0.1g/l以上となるよう添加する事が好ましい。本発明では通常はこのような培養液をそのまま使用するが、必要に応じて濃縮により培養液の水分の一部を除去してから使用することも妨げない。

添加の方法としては一度に全量を添加する方法、

7.0~10.0であるので、これらの菌株を用いる場合は、これらの範囲内のpHを選択する必要がある。

窒素源として、アンモニウム塩を使用した場合は、菌体が増殖するに伴って培養液中のpHが低下するので、培養期間中の培養液のpHを所定のpHを保つために、アンモニア、苛性カリもしくは苛性ソーダ等を添加して、培養液のpHを調節する必要がある。これらの中でアンモニアが特に好ましい。

このような条件下で通気攪拌などの方法で好気培養を行うことにより、培養液中にPQQが生成される。

次に、この培養液に α -アミノ酸およびモノメチルアミンの少なくとも一種を添加してこれらと培養液中に含有されているPQQとを酸素の存在下で反応させて、使用された α -アミノ酸またはモノメチルアミンに対応するOPPQ類を得る。ここで用いられる α -アミノ酸の代表例としてはグリシン、スレオニン、プロリン、トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、チ

逐次添加する方法どちらでも可能であるが、上記濃度とすることが必要である。

反応液のpHは、通常は、一般に2~10の範囲が好ましく、その最適pHはOPPQ類の種類により異なるが、更に詳しくは後で述べる。

反応温度は、実用上、20~100℃程度が好ましく、特に25~80℃が好ましい。

反応時間は48時間以内、好ましくは1~30時間である。

また、反応液中の溶存酸素濃度には特に制限はないが、反応を短時間で終了させるためには、0.5~1ppm以上が好ましい。そのために空気あるいは酸素またはその混合ガスなどを通気し、攪拌したり、さらに、反応槽の圧力を高めるなどの手段が使用される。

このような条件で反応させることによりPQQはOPPQ類に変化せしめられる。

PQQの菌体生産が終了した後、培養液に各種アミノ酸あるいはモノメチルアミンを添加するまでの時間は、短いほど好ましく、通常は、10時間

以内、好ましくは、2時間以内とされる。

OPQ (R=H) はグリシン、トリプトファン、プロリン、スレオニン、チロシン、セリンおよびモノメチルアミンのうち少なくとも一種を培養液に添加することにより得られ、反応pHとしてはpH6~9が特に好ましい。また、1-メチルエチルOPQ (R=CH(CH₃)₂) はバリンを、1-メチルプロピルOPQ (R=CH(CH₃)CH₂CH₃) はイソロイシンを、2-メチルプロピルOPQ (R=CH₂CH(CH₃)₂) はロイシンを、メチルOPQ (R=CH₃) はアラニンを、2-カルボキシエチルOPQ (R=CH₂CH₂CO₂H) はグルタミン酸を、2-カルボモイルエチルOPQ (R=CH₂CH₂CONH₂) はグルタミンを、2-メチルチオエチルOPQ (R=CH₂CH₂SCH₃) はメチオニンを、ベンジルOPQ (R=CH₂-C₆H₅) はフェニルアラニンを、カルボキシメチルOPQ (R=CH₂CO₂H) はアスパラギン酸を、カルバモイルメチルOPQ (R=CH₂C(=O)NH₂) はアスパラギンを、4-イミダゾリルメチルOPQ (R=CH₂-C₄H₃N₂) はヒスチジンを、4-アミノブチルOPQ (R=(CH₂)₄NH₂) はリジンを、3-グア

テ存在している場合もあるので、反応液および反応生成液のそれぞれのpHを中性乃至アルカリ性以上にし、生成されたOPQ類を一旦溶解させた後、上澄液を得る必要がある。得られた上澄液からOPQ類が分離・回収される。

上澄液からのOPQ類の分離、精製には種々の方法が用いられる。例えば沈澱法、洗浄法、限外濾過法、抽出法およびOPQ類を吸着する樹脂担体を用いる方法等が挙げられる。

これらの方法を単独あるいは組み合わせてOPQ類を分離、精製することができる。

OPQ類を分離精製する方法についてさらに具体的に説明する。

沈澱法としては、たとえば、塩酸、硫酸および硝酸などの無機酸ならびにトリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸およびトリフルオロメタンスルホン酸などの有機酸などにより反応生成液を酸性として、ヒドロキシメチルOPQ類を沈澱させる酸性沈澱法、反応生成液に、塩化ナトリウムおよび塩化カルシウムなどのアルカリ金属塩、塩化カルシウ

ムニジノプロピルOPQ (R=(CH₂)₃NHC(=O)NH₂) はアルギニンを、メルカプトメチルOPQ (R=CH₂SH) はシステインをそれぞれ培養液に添加することにより得られ、反応pHとしてはpH6~9が特に好ましい。一方、ヒドロキシメチルOPQ (R=CH₂OH) は、培養液にセリンを添加し、反応pHを2~6とすることにより得られ、最適なpHは4~6である。反応pHが6を超えることにより、OPQ (R=H) が得られる。

4-ヒドロキシベンジルOPQ (R=CH₂-C₆H₄-OH) は、培養液にチロシンを添加し、反応pHを4~8とすることにより得られ、最適なpHは6~8である。反応pHが8を超えることによりOPQ (R=H) が得られる。

このようにして得られた反応生成液から、たとえば、濾過もしくは遠心分離などの通常の固液分離手段によつて、菌体などの固形分を除去し、上澄液を得る。

pH2~5などの低pHでOPQ類を生成させた場合、生成されたOPQ類が反応生成液中で沈澱物とし

ムおよび塩化マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩を添加してOPQ類を沈澱させる塩析法または反応生成液と、たとえば、アセトンなどのOPQ類の溶解度の低い溶媒とを混合し沈澱させる溶媒沈澱法などがある。

これらの沈澱法においては、液温を低くする程、OPQ類の回収率は向上する。

前記の沈澱法によつて得られたOPQ類の粉体、または、OPQ類を含む沈澱物を、たとえば、アセトン、ジエチルエーテルおよび酸性の水のようなヒドロキシメチルOPQ類を溶かしにくい溶剤で洗浄する洗浄法を適用することにより、ヒドロキシメチルOPQ類の純度をさらに向上させることができる。

発酵法によるヒドロキシメチルOPQ類の生産において、培養液中の高分子の夾雑物を除く場合には、限外濾過法を利用することができる。

限外濾過法として、セファデックスG-10 (商品名、ファルマシア社製) およびトヨパールHVシリーズ (商品名、東ソー製) などのゲル濾過用樹脂

担体を用いる方法あるいは各種限外濾過膜や限外濾過中空糸を用いる方法などを適用することができる。

抽出法に用いる抽出剤として、水および有機溶媒等が使用される。有機溶剤としては、水との相溶性が小さい有機溶剤が好ましく、たとえば、*n*-ブタノールのような炭素数4個以上の脂肪族アルコールが好適に使用される。OPQ類を吸着する樹脂担体を用いた方法では、OPQ類を吸着・脱離することのできる樹脂担体であれば特に制限なく利用できる。この樹脂担体の代表例として、陰イオン交換樹脂担体では、多糖系担体のDEAE-セファデックスA-25(商品名、ファルマシア社製)、親水性ポリマー系樹脂のDEAE-トヨパール650(商品名、東ソー製)およびアンバーリストA-21(商品名、ローム・アンド・ハース社製)などがある。また、吸着・分離型樹脂担体では、疎水性ポリマー系樹脂のダイヤイオンHPシリーズ(商品名、三菱化成製)およびアンバーライトXADシリーズ(商品名、ローム・アンド・ハース社製)などの他に

シリカ、オクタデシルシリカおよびアルミナなどがある。疎水性クロマトグラフィ用樹脂担体では、ブチル-トヨパール650およびフェニル-トヨパール650(東ソー製)などがある。

OPQ類の同定には、元素分析、核磁気共鳴スペクトル、赤外吸収スペクトルおよび質量分析などの手段が用いられる。

また、OPQ類の定量には、高速液体クロマトグラフィーにより行うことができる。

[PQQおよびOPQ類の急性毒性および腎毒性試験]

(1) 急性毒性試験

①SPF-ICRマウス 雄、5週齢(チャールズリバー製)に、PQQ・2NaおよびOPQ類をマウス1kg当り20、40、80、160および200mgのそれぞれを腹腔投与し、14日間、25℃で飼育した。OPQ類としては、OPQ、1-メチルプロピルOPQ、2-メチルチオエチルOPQおよびベンジルOPQを用いた。なお、一群は8匹とした。その結果、PQQ・2Na 20mg/kg投与および40mg/kg投

与ではマウスは死亡しなかったが、80mg投与で5匹、160mg投与および200mg投与で8匹全部死亡した。

PQQ・2NaのLD₅₀は約70mg/kgマウスであった。

一方、OPQ類では全てのマウスが死亡しなかった。

②SPF-ICRマウス 雄、5週齢(チャールズリバー製)に、OPQをマウス1kg当り0.1g、0.2g、0.4g、0.8gあるいは1.2gのそれぞれを腹腔投与し、14日間、25℃で飼育した。なお、一群は8匹とした。OPQ0.1~0.4g投与ではすべてのマウスが死亡せず、0.8gでは2匹、1.2gでは6匹が死亡した。LD₅₀は約1.0g/kgマウスであった。

③SPF-ICRマウス 雄、5週齢(チャールズリバー製)に、OPQをマウス1kg当り1.0g、1.5gあるいは2.0gをそれぞれ経口投与し、14日間、25℃で飼育した。一群は8匹とした。

すべてのマウスは死亡しなかった。

①~③の結果より、OPQ類はPQQに比べて毒性が著しく低下していた。

(2) 腎毒性

①尿検査による腎毒性

急性毒性試験と同様にして、PQQ・2NaおよびOPQ類を腹腔投与し、マウスを飼育した。毎日、マウスの尿を採取し、臨床検査試薬(商品名:ウリステックスII、マイルス・三共製)を用いてグルコース濃度を調べた。第1表に示すように、PQQ・2Naを投与したマウスの尿からは糖が検出されたが、OPQ類を投与したマウスの尿からは糖が検出されなかった。すなわち、PQQは腎毒性が認められたが、OPQ類では腎毒性が認められなかった。

(以下余白)

第1表 (その1)

薬剤投与	経過日数 (日)									
	1	2	3	6	7	8	10	13	14	
無投与	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PQQ・2Na										
20mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40mg/kg	3+	4+	4+	3+	±	±	±	±	-	-
80mg/kg	4+	4+	4+	3+	+	±	-	-	-	-
OPQ										
20mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
800mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1200mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-メチル-5-ピロリジン										
OPQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-	グルコース	検出されず
±	"	0.10g/dl
+	"	0.25g/dl
2+	"	0.50g/dl
3+	"	1.00g/dl
4+	"	2.00g/dl

第1表 (その2)

薬剤投与	経過日数 (日)									
	1	2	3	6	7	8	10	13	14	
2-メチル-5-ピロリジン										
20mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-メチル-5-ピロリジン										
20mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

②血液検査による腎毒性

(1) 急性毒性試験と同様にして、PQQ・2Na およびOPQ類を腹腔投与し、マウスを飼育した。

投与1日後に絶食（水は与える）し、さらに18時間後に採血して血清を得た。血清中のグルコース、尿素窒素およびクレアチニン（Creatinine）を臨床検査試薬（商品名：富士ドライケムスライド、富士写真フィルム製）を用いて調べた。なお、各々の値は8匹の平均値で示した。

結果を第2表に示す。

PQQ・2Na 投与では、グルコースの大幅な減少、尿素窒素およびクレアチニンの大幅な増加がみられ、腎毒性が認められた。これに対してOPQ類投与では、グルコース、尿素窒素およびクレアチニンのそれぞれの含有量は「無投与」の場合と大差なかった。

(以下余白)

第2表 (その1)

薬剤投与 (mg/kg)	グルコース (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)
無投与	78	24	0.8
PQQ・2Na 20	70	25	0.8
40	60	110	2.3
80	57	130	3.4
160	35	139	4.2
OPQ 40	90	25	0.7
80	86	23	0.8
160	90	27	0.7
200	85	28	0.8
1-メチル-5-ピロリジン			
OPQ 40	87	26	0.8
80	104	22	0.8
160	87	27	0.8
200	66	27	0.8

第2表 (その2)

薬剤投与 (mg/kg)	グルコース (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)
2-メチルチオエチル OPQ			
40	96	26	0.8
80	88	26	0.7
160	97	26	0.6
200	72	28	0.7
ベンゾールOPQ			
40	90	23	0.7
80	87	23	0.7
160	87	26	0.7
200	84	25	0.7

(a) 急性毒性試験と同様に、OPQを150mg、300mg、400mgあるいは800mg/kg腹腔投与し、マウスを1日飼育した。

その後、絶食（水は与える）し、さらに18時間後に採血して血清を得た。血清中のグルコース、尿素窒素およびクレアチニン（Creatinine）を臨床検査試薬（商品名：富士ドライケムスライド、

富士写真フィルム製）を用いて調べた。なお、各々の値は8匹の平均値で示した。

結果を第3表に示す。

OPQのいずれの投与量でも、グルコース、尿素窒素およびクレアチニンのそれぞれの蓄積量は「無投与」の場合と大差はなかった。

第3表

薬剤投与 (mg/kg・マウス)	グルコース (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)
無投与	105	28	0.7
OPQ 150	106	32	0.8
300	80	29	0.8
400	94	30	0.8
600	74	34	0.8

①②の結果より、PQは腎毒性が認められたが、OPQ類は腎毒性が認められなかった。

[実施例]

以下実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

純水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、チアミン塩酸塩 4mg、パントテン酸カルシウム 4mg、ピオチン 20μgおよびメタノール12mlを溶解し、pHが7.1に調整された液200mlを1ℓ容三角フラスコに入れ、120℃で20分間滅菌し、これを培地とした。

これに前記と同様な培地を用いて30℃で2日間前培養された各種菌株（第4表に示す）の培養液をそれぞれ1容量%接種し、30℃で回転振盪培養を行なって、培養開始3日後に培養液を得た。

これらの培養液をそれぞれ2等分し、一方にはグリシンを0.3g/ℓとなるよう添加し、pH8.5に調整し、24時間、30℃で回転振盪してOPQ生成液を得た。残り一方には、L-セリンを0.4g/ℓとな

るよう添加し、pH4.0に調整し、30℃で24時間、回転振盪して反応を行い、ヒドロキシメチルOPQ生成液を得た。これらの反応生成液を遠心分離して上澄液を得、その中に含まれているOPQ類量を測定した。

結果を第4表に示す。

なお、OPQ類量は、高速液体クロマトグラフで求めた（以下の実施例でも同様）。

機器：島津製作所製高速液体クロマトグラフ

カラム：YMC ODS A-302

(4.6mmφ×150mm)

展開液：0.1M KH_2PO_4 、0.1M $\text{HClO}_4/\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$
= 1:9 (pH 2.5)

流速：1.5ml/min

検出器：島津SPD-6AV

UV-VIS検出器 (259nmおよび420nm)

第4表 (その1)

菌 株	OPQ蓄積量 (mg/g 上澄液)	ヒドロキシメチルOPQ 蓄積量 (mg/g 上澄液)
添 加 物	グルタミン (pH8.5)	L-セリン (pH4.0)
メチロアチアス ATCC 29475	0.1	0.1
グルコバチアス ATCC 21275	0.1	0.1
ATCC 21372	0.1	0.1
ATCC 21371	0.1	0.1
ATCC 21704	0.2	0.1
NCIB 10510	0.4	0.3
PERM P-4036	0.1	0.1
PERM P-4039	0.3	0.3
PERM P-2661	0.2	0.2
PERM P-2247	0.4	0.4
PERM P-2182	0.1	0.1
メチロバチアス NCIB 10515	0.2	0.2
メチロトロフィアス ATCC 31226	0.2	0.2
メチロアチアス DSM 1337	0.8	0.7
エクストロフィアス NCIB 10409	0.7	0.7
メチロアチアス ATCC 14821	0.7	0.7
ロチアス		
メチロアチアス NCIB 12249	0.8	0.5
ロチアス		
メチロアチアス NCIB 12243	0.6	0.6
グロトニ-		
メチロアチアス ATCC 27888	0.5	0.5
メチロトロフィアス		

第4表 (その3)

菌 株	OPQ蓄積量 (mg/g 上澄液)	ヒドロキシメチルOPQ 蓄積量 (mg/g 上澄液)
添 加 物	グルタミン (pH8.5)	L-セリン (pH4.0)
キリントアチアス DSM 338	1.2	1.1
メチロアチアス ATCC 19367	2.3	2.2
メチロトロフィアス IPO 12442	1.8	1.6
メチロアチアス NCIB 10456	2.5	2.4
メチロアチアス		
メチロアチアス PERM P-8823	0.8	0.6
メチロアチアス PERM P-9497	0.8	0.6

第4表 (その2)

菌 株	OPQ蓄積量 (mg/g 上澄液)	ヒドロキシメチルOPQ 蓄積量 (mg/g 上澄液)
添 加 物	グルタミン (pH8.5)	L-セリン (pH4.0)
メチロアチアス ATCC 29883	0.6	0.6
メチロアチアス NCIB 12417	0.5	0.5
メチロアチアス IAM 12099	0.8	0.5
メチロアチアス		
メチロアチアス PERM P-9486	0.7	0.7
メチロアチアス PERM P-4893	0.8	0.6
メチロアチアス ATCC 25398	1.3	1.2
メチロアチアス ATCC 21373	0.9	0.9
メチロアチアス NCIB 10516	0.8	0.5
メチロアチアス DSM 2668	0.7	0.6
メチロアチアス DSM 2455	0.6	0.6
メチロアチアス		
メチロアチアス NCIB 9775	1.4	1.4
メチロアチアス		
メチロアチアス IPO 14180	0.5	0.5
メチロアチアス NCIB 10517	0.4	0.4
メチロアチアス DSM 1869	8.2	8.1
メチロアチアス DSM 432	1.4	1.3
メチロアチアス		

実施例 2

純水1ℓあたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g、 KH_2PO_4 4g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2$ 0 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、パントテン酸カルシウム 4mg、およびメタノール 12mlを溶解し、pHが4.5に調整された培地を使用した以外は実施例1と同様にして、アシドモナス メタノリカ JCM 6891を3日間培養し、培養液を得た。

この培養液を二等分し、一方には、モノメチルアミン塩酸塩を0.3g/ℓとなるよう添加し、pH 8.5に調整し、24時間30℃で攪拌してOPQ反応生成液を得た。

残り一方には、L-セリンを0.4 g/ℓとなるよう添加し、pH4.0に調整し、30℃で24時間、回転振盪して反応を行い、ヒドロキシメチルOPQ生成液を得た。

これらの反応生成液を遠心分離して上澄液を得、その中に含まれるOPQ量を測定した。結果を第5表に示す。

実施例 3

純水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、ビオチン 20 μg およびメタノール12mlを溶解し、120℃で20分間殺菌し、その後、 Na_2CO_3 10重量%水溶液を無菌的に加え、pHが9.0に調整された培地を使用した以外は、実施例1と同様にしてパラコッカス アルカリフィルス JCM 7364を3日間培養し、培養液を得た。この培養液を二等分し、一方には、L-セリンを0.4g/ℓとなるよう添加し、pH8.5に調整し、30℃で24時間攪拌して、OPQ反応生成液を得た。残り一方には、L-セリンを0.4g/ℓとなるよう添加し、pH4.0に調整し、30℃で24時間攪拌してヒドロキシメチルOPQ生成液を得た。

これらの反応生成液を遠心分離して上澄液を得、その中に含まれるOPQ類を測定した。結果を第5表に示す。

実施例 4

海水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、メタノール12mlを溶解し、pHが7.1に調整された培地を使用した以外は、実施例1と同様にして、メチロファ-ガ属細菌を3日間培養し、培養液を得た。

この培養液を二等分し、一方には、L-スレオニンを0.5g/ℓとなるよう添加し、pH8.5に調整し、30℃で24時間攪拌してOPQ反応生成液を得た。残り一方には、D-セリンを0.4g/ℓとなるよう添加し、pH4.0に調整し、30℃で24時間攪拌してヒドロキシメチルOPQ生成液を得た。

これらの反応生成液を遠心分離して、上澄液を得、その中に含まれるOPQ類を測定した。

結果を第5表に示す。

(以下余白)

第5表

実施例	菌 株	OPQ蓄積量 (mg/ℓ 培養液)	ヒドロキシメチルOPQ蓄積量 (mg/ℓ 上澄液)
2	アトモナス 19798 JCM 6891	(L-セリン, pH8.5) 0.3	(L-セリン, pH4.0) 0.3
3	アラバキス 76877161 JCM 7364	(L-セリン, pH8.5) 0.5	(L-セリン, pH4.0) 0.4
4	メチロファ-ガ 19798 ATCC 35842	(L-スレオニン, pH8.5) 6.3	(D-セリン, pH4.0) 6.2
	メチロファ-ガ 19798 NCMB 2162	5.0	4.7
	ATCC 33146	2.8	2.4
	ATCC 33145	7.2	7.0
	メチロファ-ガ 19798 FERN P-3623	4.8	4.6

実施例 5

純水 1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mgおよびメタノール8mlを溶解し、pHが7.1に調整された液200mlを1ℓ容三角フラスコに入れ、120℃で20分間滅菌し、これを培地とした。

これに バイホミクロビウム ブルガレ NCIB 9775を接種し、30℃でロータリーシェーカーで回転数220回/分の回転振盪培養して得られた。この培養液を種母液とした。

純水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10g、 KH_2PO_4 1.4gを溶解した培地15ℓを30ℓ容培養槽に入れ、滅菌した。

純水10mlあたりに、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 150mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150mg、 NaCl 150mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 45mg、 H_3BO_3 3mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg、 KI 1.5mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5mgを溶解したミネラル溶液を殺菌した。

30ℓ容培養槽の温度が30℃に低下した後、槽内の培地に、このミネラル溶液10mlを無菌的に加え、さらにアンモニア水を無菌的に添加して、培養液のpHを6.8に調整した。

この培養槽内に、メタノールを150mlおよび前記の種母液200mlを無菌的に加え、通気量10ℓ/min、回転数300回/分で攪拌しつつ温度30℃、培養液pHを6.8になるようにアンモニア水を添加しながら培養した。

細菌が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下したが、排気ガス中のメタノールをガスクロマトグラフィーで分析することにより検出し、培養液中のメタノール濃度が0.1~0.5重量%になるようにメタノールを補充した。

このような方法により、7基の30ℓ容培養槽で10日間培養し、各々の培養槽内の培養液に(1)グリシン 90g、(2) L-セリン 120g、(3) D-セリン 120g、(4) L-スレオニン 150g、(5) D-スレオニン 150g、(6) L-プロリン 150g、(7) D-プロリン 150g、(8) L-チロシ

ン 210g、(9) D-チロシン 210g、(10) L-トリプトファン 240g、(11) D-トリプトファン 240gおよび(12) モノメチルアミン塩酸塩75gをそれぞれ添加し、反応液のpHを8.5になるように調節しながらさらに24時間反応を行って反応生成液を得た。

反応生成液中のOPQの蓄積量を第6表に示す。

第6表

実験No.	OPQ蓄積量 (mg/ℓ 反応生成液)
(1)	168
(2)	162
(3)	160
(4)	154
(5)	155
(6)	44
(7)	51
(8)	105
(9)	98
(10)	126
(11)	117
(12)	143

実施例6

菌株として、ハイホミクロビウム メチロバラム DSM 1869 を使用した以外は、実施例5と同様にして、7基の30ℓ容培養槽で10日間培養した培養液に、グリシンを(1) 4.5g、(2) 9.0g、(3) 15.0g、(4) 45g、(5) 75g、(6) 150gおよび(7) 225gをそれぞれ添加し、反応液のpHを8.0になるように調節しながらさらに5時間培養を行って反応生成液を得た。

反応生成液中OPQ蓄積量を第7表に示す。

第7表

実験No.	OPQ蓄積量 (mg/ℓ 反応生成液)
(1)	258
(2)	293
(3)	303
(4)	298
(5)	310
(6)	298
(7)	316

実施例7

実施例6と同様にして、ハイホミクロビウム メチロバラム DSM 1869の培養を8基の30ℓ容培養槽で10日間行なった。

その後、各々の培養槽の培養液のpHを(1) pH 3.0、(2) pH4.0、(3) pH5.0、(4) pH6.0、(5) pH7.0、(6) pH 8.0、(7) pH9.0 および(8) pH10.0とし、グリシン30gを各々の培養槽中の培養液に添加し、さらに3時間反応を行って反応生成液を得た。

各培養槽の反応生成液をそのまま遠心分離して得られた上澄液中のOPQ量および前記(1)~(5)について、反応生成液のpHを8.5に調整した後に遠心分離して得られた上澄液中のOPQ量をそれぞれ第8表に示す。

第8表

pH	OPQ蓄積量 (mg/2上澄液)	
	(A)そのまま 遠心分離	(B)pH8.5に調整後 遠心分離
(1)pH 3.0	12	202
(2)pH 4.0	179	235
(3)pH 5.0	298	296
(4)pH 6.0	293	304
(5)pH 7.0	300	301
(6)pH 8.0	298	—
(7)pH 9.0	294	—
(8)pH10.0	280	—

実施例8

実施例6と同様にして、ハイボミクロビウム
メチロバラム DSM 1869の培養を8基の30ℓ容
培養槽で10日間行なった。

その後、各々の培養槽の反応液のpHを(1) pH2.0、(2) pH3.0、(3) pH4.0、(4) pH5.0、(5) pH 6.0、(6) pH7.0、(7) pH8.0、(8) pH9.0
(9) pH10.0 とし、L-セリン 42gを各々の培養
槽中の培養液に添加し、5時間反応を行って反応生
成液を得た。

各培養槽の反応生成液をそのまま遠心分離して
得られた分離液中のOPQおよびヒドロキシメチ
ルOPQ量ならびに反応生成液のpHを8.5に調整し
た後、遠心分離した場合の分離液中のOPQおよ
びヒドロキシメチルOPQ量を第9表(1)(2)
に示す。

(以下余白)

第9表(1)

pH	OPQ蓄積量 (mg/2反応液)	
	(A)そのまま 遠心分離	(B)pH8.5に調整後 遠心分離
(1)pH 2.0	3	20
(2)pH 3.0	5	49
(3)pH 4.0	7	51
(4)pH 5.0	11	55
(5)pH 6.0	148	149
(6)pH 7.0	258	260
(7)pH 8.0	283	—
(8)pH 9.0	280	—
(9)pH10.0	258	—

第9表(2)

pH	ヒドロキシメチルOPQ蓄積量 (mg/2反応液)	
	(A)そのまま 遠心分離	(B)pH8.5に調整後 遠心分離
(1)pH2.0	10	120
(2)pH3.0	15	187
(3)pH4.0	149	281
(4)pH5.0	272	270
(5)pH6.0	253	243
(6)pH7.0	98	101
(7)pH8.0	50	49

実施例9

実施例6と同様にして、ハイボミクロビウム
メチロバラム DSM 1869の培養を4基の30ℓ容
培養槽で10日間行なった。

その後、各々の培養槽内の培養液の温度を(1)
20℃、(2) 30℃、(3) 40℃、(4) 50℃、(5)
70℃とし、L-スレオニン 48gを各々の培養槽内

の培養液に添加し、培養液のpHを8.0に調整しながら5時間反応を行って反応生成液を得た。

反応生成液のOPQ蓄積量を第10表に示す。

第10表

温度	OPQ蓄積量 (mg/ℓ 反応生成液)
(1) 20℃	253
(2) 30℃	294
(3) 40℃	317
(4) 50℃	317
(5) 70℃	300

実施例10

実施例6と同様にして、メチロパチルス グリコゲネス PERM P-2247を培養した。培養開始4日目の培養液に、モノメチルアミン塩酸塩 27gを添

った。

実施例13

純水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mgおよびメタノール 12mlを溶解し、pHが7.1に調整された液200mlを1ℓ容三角フラスコに入れ、120℃で20分間殺菌し、これを培地とした。

これにハイボミクロビウム ブルガレ NCIB 9775を接種し、30℃でロータリーシェーカーで回転数220回/分の回転振盪培養によって得られた培養液を種母液とした。

純水1ℓあたりに、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g、 KH_2PO_4 1.4gを添加した培地15ℓを30ℓ容培養槽に入れ、滅菌した。

純水10mlあたりに、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 150mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150mg、 NaCl 150mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$ 45mg、 H_3BO_3 3mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg、 KI 1.5mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

加し、培養液のpHを8.0に調整しながらさらに6時間培養を続けて反応生成液を得た。

反応生成液のOPQの蓄積量は、220mg/ℓであった。

実施例11

実施例6と同様にして、パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 19387を培養した。

培養開始10日目の培養液に、D-セリン 42gを添加し、培養液のpHを8.0に調整しながら反応を6時間行なって反応生成液を得た。

反応生成液のOPQの蓄積量は、140mg/ℓであった。

実施例12

培地に使用する水として、海水を用いた他は、実施例6と同様にして、メチロファアガ サラシカ ATCC 33146を培養した。培養開始10日目の培養液に、D-スレオニン 48gを添加し、培養液のpHを8.0に調整しながら反応を6時間行なって反応生成液を得た。

反応生成液のOPQの蓄積量は163 mg/ℓであ

$4\text{H}_2\text{O}$ 1.5mgを溶解したミネラル溶液を滅菌した。

30ℓ容培養槽の温度が30℃に低下した後、前記の槽内の培地にこのミネラル溶液10mlを無菌的に加え、さらにアンモニア水を無菌的に添加して、培養液のpHを6.8に調整した。

この培養槽内に、メタノールを150mlおよび前記の種母液200mlを無菌的に加え、通気量10ℓ/分、回転数300回/分で攪拌しつつ、温度30℃、アンモニア水を添加しながら培養液のpHを6.8に維持しながら培養した。細菌が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下したが、それを排気ガス中のメタノールをガスクロマトグラフィーで分析することにより検出し、この低下分に相当する量のメタノールを補充して培養液中のメタノール濃度を0.1~0.5重量%に維持した。

このような方法により、2台の30ℓ容培養槽で10日間培養し、各々の培養槽内の培養液のpHを塩酸で4.0に調整したのち、(1) L-セリン 120g/15ℓおよび(2) D-セリン 120g/15ℓとなるよう、それぞれ添加し、空気で通気攪拌しつつ、

培養液のpHを4.0になるように調節しながら、30℃で24時間反応を行なって反応生成液を得た。

反応生成液のpHを7.0に調整した後、遠心分離し、上澄液を得た。上澄液中に含まれるヒドロキシメチルOPQの蓄積量を第11表に示す。

第11表

実験 No.	ヒドロキシメチルOPQ蓄積量 (mg/g 反応生成液)
(1)	140
(2)	137

実施例14

菌株として、ハイホミクロビウム メチロバラム DSM 1869を使用した以外は、実施例13と同様にして、30g 容培養槽で10日間培養し、その後、培養液のpHを4.0に調整し、L-セリンを42g添加し、反応を行なった。

L-セリンを添加した後、各時間毎に反応生成

L-セリン42gを添加し、6時間反応を行ない、反応生成液を得た。反応生成液のpHを7.0に調整した後、遠心分離し、上澄液を得た。上澄液中に含まれるヒドロキシメチルOPQの蓄積量は、1gあたり200mgであった。

実施例16

菌株を変更した以外は実施例13と同様にして、パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 19367の培養を30g 容培養槽で10日間培養した。

その後、培養槽中の培養液のpHを6.0に調整し、D-セリン42gを添加し、6時間反応を行ない、反応生成液を得た。ヒドロキシメチルOPQの蓄積量は、反応生成液1gあたり110mgであった。

実施例17

菌株を変更し、培地に使用する水として海水を用いた他は、実施例13と同様にして、メチロファーマーガ サラシカ ATCC 33146を30g 容培養槽で10日間培養した。

その後、培養槽中の反応液のpHを4.0に調整し、D-L-セリン42gを添加して、空気で通気攪拌しな

液を採取し、pH7に調整した後遠心分離し、その反応生成液に含まれるヒドロキシメチルOPQ量を測定した。

その結果を第12表に示す。

第12表

L-セリン添加後の 時間	ヒドロキシメチルOPQ蓄積量 (mg/g 反応生成液)
1 時間	35
2 時間	109
4 時間	177
10 時間	240
14 時間	262

実施例15

菌株を変更した以外は、実施例13と同様にして、メチロバチルス グリコゲネス FERM P-2247の培養を30g 容培養槽で4日間行なった。

その後、培養槽中の培養液のpHを4.5に調整し、

がら30℃で6時間反応を行なって、反応生成液を得た。反応生成液のpHを7.0に調整した後、遠心分離し、上澄液を得た。その上澄液中に含まれるヒドロキシメチルOPQの蓄積量は1g当たり142mgであった。

実施例18

実施例14と同様にして、ハイホミクロビウム メチロバラム DSM 1869の培養を30g 容培養槽を用いて行い、培養液15gを得た。この培養液を各々200mlづつを1g 容三角フラスコに入れ、各種アミノ酸を0.6gづつ添加し、NaOHあるいはHClを用いてpH 4、7あるいは9とし、30℃で振盪させながら24時間反応を行って反応生成液を得た。

各フラスコの反応生成液のpHを7.0に調整した後、遠心分離して得られた上澄液中のOPQ蓄積量をそれぞれ第13表に示す。

(以下余白)

第13表

No	添加アミノ酸	生成X-OPQ量 (mg/g)		
		反応pH 4	反応pH 7	反応pH 9
1	グリシン	204	322	309
2	L-アラニン	144	185	187
3	L-バリン	145	177	244
4	L-ロイシン	150	239	243
5	L-イソロイシン	139	213	280
6	L-メチオニン	101	131	138
7	L-グルタミン酸	142	222	217
8	L-グルタミン	232	305	303
9	L-フェニルアラニン	201	379	319
10	L-アスパラギン酸	79	147	113
11	L-アスパラギン	14	220	215
12	L-アルギニン	115	189	40
13	L-ヒスチジン	89	181	68
14	L-リジン	89	68	5

X-OPQ: それぞれの添加アミノ酸に対応するOPQ類
を示し、具体的な対応は次の表の通りで
ある。

添加アミノ酸と対応するX-OPQ

添加アミノ酸	X-OPQ
グリシン	OPQ
L-アラニン	メチルOPQ
L-バリン	1-メチルエチルOPQ
L-ロイシン	2-メチルブチルOPQ
L-イソロイシン	1-メチルブチルOPQ
L-メチオニン	2-メチルチオエチルOPQ
L-グルタミン酸	2-カルボキシエチルOPQ
L-グルタミン	2-カルボキシルエチルOPQ
L-フェニルアラニン	ベンジルOPQ
L-アスパラギン酸	カルボキシメチルOPQ
L-アスパラギン	カルボキシルメチルOPQ
L-アルギニン	3-グアニジノブチルOPQ
L-ヒスチジン	4-イミダゾリルメチルOPQ
L-リジン	4-アミノブチルOPQ

実施例19

実施例18で用いたPQQ含有培養液と同じ培養液を
各々200mlづつ12個の1g容三角フラスコに入れた。

各々のフラスコに、L-スレオニン、L-チロシン、
L-セリンあるいはL-システインを各々0.6gづつ添
加し、NaOHあるいはHClを用いてpHを4、7あるいは
9とし、30℃で振盪させながら24時間反応を行って
反応生成液を得た。

各フラスコの反応生成液のpHを7.0に調整した後
に、遠心分離して得られた上澄液中のOPQ類
量をそれぞれ第14表に示す。

各々の反応液中には、各々のアミノ酸に対応す
るOPQ類の他に、OPQも存在した。

(以下余白)

第14表

No	添加 アミノ酸	反応pH	生成OPQ類 (mg/g)	
			OPQ	X-OPQ
1	L-スレオニン	4	115	34
2	L-スレオニン	7	291	13
3	L-スレオニン	9	311	3
4	L-チロシン	4	11	91
5	L-チロシン	7	45	209
6	L-チロシン	9	157	59
7	L-セリン	4	13	182
8	L-セリン	7	262	66
9	L-セリン	9	309	10
10	L-システイン	4	5	5
11	L-システイン	7	45	58
12	L-システイン	9	28	10

X-OPQ: それぞれの添加アミノ酸に対応するOPQ類
を示し、具体的な対応は次の表の通りで
ある。

添加アミノ酸と対応するX-OPQ

添加アミノ酸	X-OPQ
L-スレオニン	1-ヒドロキシエチル
L-チロシン	4-ヒドロキシベンジル
L-セリン	ヒドロキシメチル
L-システイン	メルカプトメチル

実施例20

第15表

実施例9のうち培養槽内の培養液の温度を30℃として得たOPQ含有反応液を12,000×gで20分間遠心分離した上澄液を用いてOPQの回収実験を行った。

各々50mlづつをHClを用いて、pH 7.2、6.5、5.7、5.0、4.7、4.2、3.7、3.1、2.6、2.1、1.5および1.0に調整し、室温で4時間放置後、12,000×gで20分間遠心分離し、OPQを沈殿として回収した。上澄液中に残存するOPQを高速液体クロマトで分析した結果を第15表に示す。OPQはpH4以下で沈殿として回収できることがわかる。

(以下余白)

p H	上澄液中の残存OPQ量 (mg/g 反応生成液)
7.2	284
6.5	285
5.7	272
5.0	288
4.7	269
4.2	191
3.7	66
3.1	24
2.6	14
2.1	7
1.5	12
1.0	15

[発明の効果]

本発明により、細菌を使用して得られたPQQを含有する培養液からPQQを分離・回収・精製することなくオキサゾピロキノリン類を容易にかつ安定的に得ることが可能である。

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

//(C 07 D 498/14
209:00
263:00
215:00)

7624-4C
7019-4C

優先権主張 ③平2(1990)2月28日③日本(JP)③特願 平2-28907

②発明者 菅村 和弘 新潟県新潟市松浜町3500番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟工業所内